geneBOX
DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant, centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 Cantanhede, Portugal
tel:+ 351 231410946
fax:+351 231 410947
e-mail:info@genebox.com

Código do Produto: 6110

Shigella sp
Qual PCR Box 1.0

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções

Versão1.1; Abril de 2011

Índice

Referências

1. Espy M, Uhl J, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, Yao J, Wengenack N, Rosenblatt J, Cockerill F, Smith F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine LaSHISPatory Testing Clin Microbiol Rev 2006; 19(1):165-256

2. Villalobo E, Torres A. PCR for detection of Shigella spp. in mayonnaise. Appl Environ Microbiol. 1998 Apr;64(4):1242-5.

3. Theron J, Morar D, Du Preez M, Brözel VS, Venter SN. A sensitive seminested PCR method for the detection of Shigella in spiked environmental water samples. Water Res. 2001 Mar;35(4):869-74.

4. Peng X, Luo W, Zhang J, Wang S, Lin S. Rapid detection of Shigella species in environmental sewage by an immunocapture PCR with universal primers. Appl Environ Microbiol. 2002 May;68(5):2580-3.

Folha de Dados de Segurança (3/3)
Material Safety Data Sheet (MSDS)

Equipamento especial de combate ao incêndio: quando são libertadas grandes quantidades de substância trabalhe apenas com protecção adequada para olhos e pele.

11. Medidas a tomar no caso de derrame acidental

Precauções pessoais: evite o contacto directo com a substância.
Limpeza: limpe normalmente a área afectada, não são necessários cuidados adicionais.
Protecção da pele: use uma bata de laboratório.

12. Informação ecológica

Não existem dados disponíveis.

13. Informação sobre a eliminação

Elimine o material de acordo com toda a regulamentação aplicável (Grupo IV – resíduos hospitalares específicos).

14. Informação sobre o transporte

No transporte dos Kits devem estar a seguradas as temperaturas, não devendo ultrapassar os 15ºC. A duração do transporte não deve ser superior a 3 dias, de modo a garantir que todos os componentes do Kit cheguem em perfeitas condições aos seus destinatários.

15. Contactos Úteis

Número Nacional de Emergência: 112
Centro de Informação Anti-Venenos: 808 250 143

16. Outras informações

As informações a cima disponíveis são baseados no nível de conhecimento actual, devendo ser utilizado apenas como guia. A geneBOX - R&D Diagnostic Tests não se responsabiliza por qualquer dano causado pela manipulação inapropriada ou pelo contacto com os referidos produtos.

Para mais esclarecimentos, por favor contactem com o apoio técnico para o +351 231 410 946

Apresentação

Shigella sp, bactérias Gram negativas, é o agente etiológico da shigelose humana, associada a disenteria. A bactéria é muito invasiva, no entanto, a doença pode ser evitada pela adopção de medidas de higiene básicas, uma vez que a sua transmissão é efectuada via fecal-oral e por alimentos e água contaminados.

***Shigella sp* Qual PCR Box 1.0** é um teste para diagnóstico molecular desta bactéria, com maior sensibilidade, especificidade e rapidez do que os métodos tradicionais por cultura.

***Shigella sp* Qual PCR Box 1.0** Detecta DNA genómico codificante de virA de Shigella sp em amostras biológicas.

Alterações e melhoramento do Produto

Este produto pode ser melhorado ao nível do seu rendimento, interpretação especificidade de forma a incluir novas variantes que venham a ser descritas.

As alterações, adições ou modificações de SHISP Mix, Controlo Interno, Controlo Positivo ou Controlo Negativo, em relação ao lote anterior estão detalhadas na tabela abaixo:

Tubo	Modificação	Motivo
N/A		

Folha de Dados de Segurança (2/3)
Material Safety Data Sheet (MSDS)

4. Informação Toxicológica

Químico	Toxicidade
Glicerol	LD50= oral 4090 mg/kg (ratinho) LD50= oral 12600 mg/kg (rato) LD50= oral 1480 mg/kg (humano)

5. Estabilidade e reactividade

Condições a evitar: Calor e humidade.
Incompatibilidades: Bases e agentes oxidantes fortes.

6. Protecção pessoal.

Protecção das mãos: use luvas apropriadas, resistentes a químicos.
Protecção dos olhos: recomenda-se o uso de óculos de protecção química.

7. Manipulação e armazenamento

Manipulação: evite o contacto directo com a substância.
Armazenamento: armazene à temperatura aconselhada, proteja do contacto com a luz.
Danificação da embalagem protectora: rejeitar o constituinte contido na embalagem.

8. Perigos

Os componentes da mistura de reacção podem ser perigosos se inalados, ingeridos ou absorvidos pela pele. Este material pode causar irritação da pele, dos olhos e do tracto respiratório. A ingestão de grandes quantidades desta mistura pode causar dores de estômago, vómitos ou diarreia.

9. Medidas de Primeiros Socorros

No caso de **contacto com os olhos**, deve lavar imediatamente os olhos com água abundante por cerca de 15 minutos. Deve consultar o seu médico.
No caso de **contacto com a pele**, deve lavar imediatamente a zona afectada com água corrente e sabão. Lave a roupa contaminada antes da sua utilização.
No caso de **ingestão**, lave a boca com água abundante. Deve contactar o seu médico se necessário.
No caso **de inalação**, mudar a vítima para um local arejado. Se encontrar inanimado aplique respiração artificial. Se apresentar dificuldades respiratórias aplique oxigénio. Deve consultar o seu médico.

10. Medidas a tomar em caso de incêndio

Meios de extinção: Água, dióxido de carbono, pó químico seco ou espuma apropriada.
Meios de extinção não aconselhados: não existem restrições conhecidas.
Perigos específicos de exposição: em caso de incêndio podem emitir fumos tóxicos de dióxido e monóxido de carbono, nitrogénio, fósforo, cloreto de hidrogénio, e gás hidrogénio.

Folha de Dados de Segurança (1/3)
Material Safety Data Sheet (MSDS)

geneBOX - R&D Diagnostic Tests™ PCR Kits

Produtos PCR da geneBOX ™
Esta folha de dados de segurança é aplicável a todos os produtos de PCR da geneBOX™.

1. Produtos Químicos e Identificação da Companhia

Data de realização:	Dezembro de 2010
Grupo do produto:	Produtos de PCR da geneBOX™
Manufacturação:	geneBOX - R&D Diagnostic Tests, biocant, centro de inovação em biotecnologia núcleo 4, lote 3 3060-197 Cantanhede, Portugal
tel:	+ 351 231410 946
fax:	+351 231 410 947
e-mail:	info@genebox.com

2. Composição e Informação sobre os reagentes

Componente	Químico	Nome vulgar	Nº de lote
Mistura de primers	Acido Desoxiribonucleico	Oligonucleótido	
Mistura de reacção	Desoxiribonucleótidos	Nucleótidos	
	Tampão		
	Cloreto de Magnésio	MgCl2	
	Vermelho de Cresol		
	Glicerol		
	DNA polimerase		
Controlo interno	Acido Desoxiribonucleico	Oligonucleótido	
Controlo positivo	Acido Desoxiribonucleico	DNA	
Controlo negativo	H_2O	Água bidestilada estéril	

3. Propriedades físico-químicas:

Componente	Aspecto	Cor	Odor
Mistura de primers	líquido	incolor	nenhum
Mistura de reacção	líquido	vermelho/rosa	nenhum
Controlo Interno	líquido	incolor	nenhum
Controlo Positivo	líquido	incolor	nenhum
Controlo Negativo	líquido	incolor	nenhum

Controlo de Qualidade

O kit Shigella sp Qual PCR Box 1.0 foi testado com DNAs extraídos de culturas celulares das linhas DSM 4782 de *Shigella* e outras espécies de bactérias obtendo amostras positivas e negativas. A Genebox garante a qualidade e a fiabilidade do seu kit Shigella sp Qual PCR Box 1.0.

Especificidade

O kit Shigella sp Qual PCR Box 1.0 é específico para a detecção do gene *virA* de *Shigella sp* em DNA de amostras biológicas.

A sua especificidade foi comprovada com DNAs extraídos de culturas celulares das linhas DSM 4782 de *Shigella sp*, e DNAs de outras espécies de bactérias obtendo amostras positivas e negativas.

A especificidade do kit Shigella sp Qual PCR Box 1.0 é conferida por SHISP mix, que apresenta 100% de homologia com todas as sequências de *Shigella sp* registadas em bases de dados.

Sensibilidade

A sensibilidade do kit Shigella sp Qual PCR Box 1.0 foi testada e a Genebox garante a detecção de níveis mínimos de *virA* do genoma de *Shigella sp* até 0,1 ng de DNA.

Componentes do Shigella sp Qual PCR Box 1.0 Kit

- **Mistura de reacção SHISP**

  1 tubo **SHISP mix** – 1 ml (conservar de -30 a -15ºC)

- **Controlo Interno CI**

  1 tubo **CI** – 100 µl (conservar de -30 a -15 ºC)

- **Controlo Positivo CP**

  1 tubo **CP** - 50 µl (conservar de -30 a -15 ºC)

- **Controlo Negativo CN**

  1 tubo **CN** - 50 µl (conservar de -30 a -15ºC)

- **Manual de instruções**

  1 Manual de Instruções

Componentes da PCR Master Mix

Nucleótidos:
concentração final de cada dNTP é 600 µM

Tampão da PCR:
concentrações finais são 3,3x NH_4, 2,0 mM $MgCl_2$ e 0,4 u/µl Taq DNA polimerase, pH 8.3.

Glicerol:
concentração final é 16,6%

Vermelho de cresol:
concentração final é de 300µg/ml

Declaração de Conformidade

Nome do Produto: Shigella sp Qual PCR Box 1.0

Numero do Produto: GB.6110

Utilização: Detecção de *Shigella sp.*

Produção: geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede, portugal

Nós, geneBOX - investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico, indubitavelmente declaramos que este produto, ao qual se relaciona esta declaração de conformidade, está em conformidade com os seguintes documentos normativos, ISO 9001:2008 e ISO 13485:2004. Seguindo ainda, as indicações da Directiva Europeia 98/79/CE sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*, conformidade de acordo com o Anexo IV, transposto para as leis nacionais dos estados membros da União Europeia.
Europeia.

A ficha e os documentos técnicos deste produto são mantidos na geneBOX, biocant, centro de inovação em biotecnologia, 3060-197 Cantanhede, Portugal.

Sandra Balseiro
Directora Técnica

Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico garante que os primers presentes no Shigella sp Qual PCR Box apresentam as especificidades dadas nas folhas e tabelas de interpretação de resultados do produto.

1. SHISP mix, CI, CP e CN

Armazenamento a -20ºC, SHISP mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 12 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).
Armazenamento a 4ºC, de SHISP mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 15 dias a partir da data de recepção.
À temperatura ambiente, SHISP mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 3 dias a partir da data de recepção.
SHISP mix, CI, CP e CN nunca devem ser deixados ou armazenados com a tampa aberta.

2. DNA

O DNA extraído por *salting out* ou por qualquer outro método deve ser armazenado a 4ºC ou -20ºC. Ao optar pela congelação das amostras, devem ser evitadas ciclos repetidos de congelação/descongelação, de modo a impedir a degradação da amostra.
As amostras de DNA armazenadas em dH_2O permanecem estáveis durante, pelo menos, 4 semanas (a 4ºC) ou 2 anos (a -20ºC).
As amostras de DNA armazenadas em tampão TE permanecem estáveis durante, pelo menos, 2 anos (a 4ºC) ou 5 anos (a -20ºC).

Aviso de garantia

geneBOX –investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico responsabiliza-se, perante os seus clientes, pelos defeitos no material e componentes dos seus produtos aplicados em condições normais. Os produtos da empresa que apresentam esta garantia devem ser substituídos, sem encargos para o cliente.

Esta garantia aplica-se só para produtos que sejam manipulados e armazenados de acordo com as especificações e recomendações de utilização.

As reclamações devem ser enviadas, por escrito, directamente para a geneBOX e devem ser acompanhadas por uma cópia da guia de transporte ou factura do produto.

Este produto não pode ser reformulado, reembalado ou revendido em nenhuma forma sem o expresso consentimento da geneBOX - investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico.

Protocolo de amplificação por PCR (1/4)

Pré-análise

1- Colheita de amostras

Para garantir um teste de alta qualidade das amostras devem ser colhidas nas seguintes condições:

A - Plasma e soro⁺

A amostra de sangue deve ser colhida para Tubos de colheita *2-10ml BD Vacutainer® Blood EDTA* ou Tubos de colheita *Vacutainer® BD Blood Serum* (vidro ou plástico). Alternativamente, podem ser usados tubos de colheita com marcação CE de outras marcas.
NÃO UTILIZAR AMOSTRAS HEPARINIZADO COM ESTE MÉTODO.

B – Zaragatoas⁺

A amostra deve ser colhida com uma zaragatoa Dacron® de plástico. Alternativamente, podem ser usadas zaragatoas de plástico com marcação CE de outras marcas. Não use zaragatoas de alumínio ou madeira. Após a colheita as amostras podem ser transportados em meio de cultura 1-2 ml, como nos seguintes exemplos:

- STM AMPLICOR (meio de transporte da amostra, Roche, Inc.)
- Kit para colheita de zaragatoas (Digene Corporation)
- Médio de PBS a 10% (*Home made*)

⁺ *Precaução: Todas as amostras têm de ser tratadas como material potencialmente infeccioso.*
NOTA: Os Nossos Kits também podem ser usado com amostras de fezes e urina (desde que se utilize um kit de extracção adequado)

2- Armazenamento da Amostra

A sensibilidade do teste pode ser reduzida com o processo repetitivo de congelação/descongelação ou com longos períodos de armazenamento.

Protocolo de amplificação por PCR (2/4)

A - Plasma e soro

Se o plasma ou soro for testado dentro de 24 horas, após a sua colheita, as amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente (15-25°C). Se o teste é realizado dentro de uma semana, as amostras devem ser armazenadas no frio (2-8 °C) ou por períodos mais longos entre -15/-30 ° C.

B – Zaragatoas

Se a amostra for testada dentro de 24 horas, após a sua colheita, as zaragatoas podem ser armazenadas à temperatura ambiente (15-25°C). Se o teste é realizado dentro de uma semana, as amostras devem ser armazenadas no frio (2-8 °C) ou por períodos mais longos entre -15/-30 ° C.

3- Transporte de amostras

A sensibilidade do teste pode ser reduzida se as amostras forem expostas a altas temperaturas por um longo período de tempo.

A - Plasma e soro

O sangue colhido deve ser armazenado a frio (2-8°C) até ao envio e deve ser transportado em conformidade com as instruções nacionais para o transporte amostras Biológicas/patogénicos. Para garantir uma boa qualidade da amostra, estas devem ser transportadas dentro de 24-48h.

B – Zaragatoas

A amostra colhida deve ser armazenada a frio (2-8°C) até ao envio e deve ser transportada em conformidade com as instruções nacionais para o transporte amostras Biológicas/patogénicos. Para garantir uma boa qualidade da amostra, estas devem ser transportadas dentro de 24-48h.

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o Shigella sp Qual PCR Box 1.0 recomenda-se o uso de qualquer kit de extracção de DNA que apresente marcação CE, de modo a obter um DNA extra puro.

2. DNA Polimerase

O Shigella sp Qual PCR Box 1.0 foi intensivamente testado utilizando a DNA polimerase da Reagente 5 (Reagente 5, Lisboa, Portugal).

3. SHISP mix

Para uma boa performance detecção de *Shigella sp* com o Shigella sp Qual PCR Box 1.0 é obrigatória a utilização da SHISP Mix fornecida com o Kit.

4. Procedimentos de amplificação

Para uma correcta utilização do kit aconselha-se a seguir o programa de PCR apresentado neste Manual de Instruções.

5. Termociclador

Recomenda-se utilização de qualquer Termociclador que apresente as seguintes características:
- "heating rate" superior a 2.5ºC/sec; "cooling rate" superior a 1.5ºC/sec; gama de temperaturas 4-100ºC; uniformidade de temperaturas ±0.5ºC; "heated lid" superior a 100ºC.

6. Validade

Como especificado na embalagem

Se os problemas persistirem, por favor contactem com o apoio técnico para o +351 231 410 946

Avisos e precauções

- Os componentes dos kits são resistentes às temperaturas de armazenamento indicadas. O armazenamento dos kits a temperaturas não recomendadas podem levar a rupturas no material e contaminação dos reagentes dos kits.

- Os materiais plásticos fornecidos neste kit são resistentes à gama de temperaturas de utilização e armazenamento recomendadas. A sua utilização em gamas distintas de temperaturas pode causar rupturas impossibilitando a utilização normal do kit.

- Verifique a concentração e qualidade de todas as amostras de DNA antes de utilizar este kit.

Instruções de gerais de segurança no laboratório:

- Não coma, beba ou fume dentro do laboratório.
- Utilize sempre luvas descartáveis e mude-as com frequência.
- Utilize batas limpas e proteja os olhos (sempre que se justifique).
- Lave as mãos antes e depois de qualquer manipulação de amostras ou reagentes.
- Lave a área de trabalho antes e depois de qualquer manipulação.
- Não pipete com a boca.

Protocolo de amplificação por PCR (3/4)

Extracção de DNA

A sensibilidade do teste pode ser reduzido se você usar um método de isolamento de DNA ineficiente. A detecção destes tipo de bactéria requer amostras de DNA altamente puras e concentradas. As quantidade e qualidade das amostras dependem do protocolo de isolamento de DNA usado. Recomenda-se a kits de isolamento seguintes, tanto para plasma/soro como para zaragatoas:

- QIAamp DNA Mini Kit (from QIAGEN)
- QIAamp DNeasy Kit (from QIAGEN)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (from QIAGEN)

Alternativamente, podem ser usados outros kits com a marcação CE para extracção de DNA, que garantam DNA com rácio DO260/280 superior a 1,6 e concentrações entre 1ng - 200 ng/µl.

Reagentes

- Amostra de DNA
- Mistura de reacção **SHISP mix**
- Controlo interno **CI**
- Controlo positivo **CP***
- Controlo negativo **CN**
- Água bi-destilada estéril (não fornecida)

* Este componente apresenta alto potencial contaminante, dado conter DNA de *Shigella sp*, recomenda-se o máximo cuidado no seu manuseamento.

Protocolo de amplificação por PCR (4/4)

Amplificação por PCR

1. Agite brevemente todos os tubos do kit e os tubos de DNA
2. Para cada detecção pipete de acordo com a tabela I.

Tabela I

Componente	1 Reacção
Tubo SHISP mix	8 µl
Tubo Controlo Interno **CI**	1 µl
DNA de amostra	1 µl
Volume final	10 µl

NOTA: Por cada utilização do kit deve correr, pelo menos, uma reacção CP e CN**.**

3. Para o controlo positivo proceder como em (2), substituindo o DNA de amostra por 1 µl de **Tubo** Controlo Positivo **CP**.
4. Para o controlo negativo proceder como em (2), substituindo o Controlo Interno por 1 µl de água bidestilada estéril e o DNA de amostra por 1 µl de **Tubo** controlo negativo **CN.**
5. Coloque os componentes da reacção no termociclador e corra o seguinte programa de PCR.

Programa PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	95 ºC	1 min	1
Desnaturação Emparelhamento Extensão*	95 ºC 60 ºC 72 ºC	10 seg 45 seg 45 seg	40
Fim	4 ºC	Infinito	1

6. Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 4%. Use a Tabela de interpretação de resultados para interpretar os resultados.

Avisos e precauções

A amplificação por PCR permite-nos obter milhões de cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra. Infelizmente isto também é verdade para o DNA contaminante, que pode comprometer performance da nossa reacção. Consequentemente, práticas laboratoriais específicas podem evitar a presença de amplificações inespecíficas. Em baixo encontram-se descriminadas as recomendações da Genebox:

- Separe fisicamente as áreas de pré-PCR e de pós-PCR.

- O fluxo Laboratorial deve ser sempre unidireccional da área pré-PCR para a área pós-PCR.

- Deve sempre utilizar-se equipamentos específicos para cada area de trabalho (preparação de amostras; pré-amplificação amplificação e pós-amplificação).

- Todos os equipamentos utilizados na área de pós-PCR não devem sais desta zona.

- Utilize micropipetas, luvas e batas específicas para cada área.

- Utilize preferencialmente luvas sem talco (uma vez que o talco pode inibir a reacção de PCR).

- Utilize pontas de filtro de forma a minimizar contaminações cruzadas.

- Verifique periodicamente as micropipetas de forma a assegurar a variação de pipetagem inferior a 5%.

- Utilize micropipetas adaptadas a cada volume de pipetagem.

- Verifique periodicamente os termocicladores, de forma a assegurar a variação de temperaturas inferiores a 1%.

- Abra e feche os reagentes com cuidado. Depois de utilizar armazene os restantes componentes do kit às temperaturas recomendadas devidamente fechados.

- Não utilize o kit com a validade expirada.

PROBLEMAS	POSSIVEIS CAUSAS	SUGESTÕES
Falsos negativos de uma banda específica com o controlo interno normal	Degradação da amostra de DNA	Reextraia a amostra de DNA de material fresco
		Repita a reacção com um DNA de boa qualidade
Esfregaço de bandas	Degradação da amostra de DNA	Reextraia a amostra de DNA de material fresco
		Repita a reacção com um DNA de boa qualidade
	Amostra de DNA muito concentrada	Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Dissolva o DNA em $_{dd}H_2O$ de forma a obter a concentração exacta
		Repita a reacção com um DNA de boa qualidade
	Problemas com tampão de electroforese: Fora de prazo ou composição errada	Use um tampão recomendado novo

Protocolo de electroforese em gel de agarose

Preparação do gel de agarose a 4%

1. Dissolver **8 gramas** de pó **agarose** em **200 ml** de tampão **TAE 1X**.
2. Dissolver completamente a agarose aquecendo-a no microondas.
3. Arrefeça o gel até, aproximadamente, 50ºC.
4. Adicione pelo menos **20 µl de brometo de etídio**++ (10 mg/ml) **ou de Sybr Safe** (10000x concentrado à agarose). Agite até estar completamente incorporado.
5. Numa superfície nivelada, monte a placa do gel com 96 poços.
6. Verta uma camada de gel com cerca de **5mm**.
7. Deixe o gel arrefecer.

++ Atenção este reagente é um forte agente mutagénico (leia atentamente a MSDS do produto).

Electroforese

1. Submirja o gel na tina de electroforese com tampão TAE 1X.
2. Remova os pentes com cuidado do gel.
3. Adicione **10 µl** do **produto de PCR** em cada poço.
4. Ligue a tina de electroforese à corrente com uma voltagem média (**115V**).
5. Deixe a electroforese correr por cerca de 20 minutos, ou até o corante estar a 2/3 da linha.
6. Ponha o gel no transiluminador.
7. Fotografe o gel e identifique-o.
8. Use a ***Tabela de interpretação de resultados*** para interpretar os resultados.

Tabela de Interpretação de resultados

Tabela I – Interpretação de análises válidas

Poço	*Shigella sp *171pb*	Controlo Interno **101pb	Interpretação	Validação
Amostra	+	+	*Shigella sp* Positivo	Validado
Amostra	-	+	*Shigella sp* Negativo	Validado
CP	+	+	Controlo positive	Validado
CN	**-**	-	Controlo Negativo	Validado

* Tamanho da banda específica; ** Tamanho da banda de Controlo Interno

Tabela II- Interpretação de análises não válidas

Poço	*Shigella sp *171pb*	Controlo Interno **101pb	Interpretação	Validação
Amostra	+	-	*Shigella sp* Positivo (?)	Repetir reacção
Amostra	**-**	-	*Shigella sp* negativo (?)	Repetir reacção
CP	**+**	-	Controlo positivo invalido	Repetir reacção
CP	**-**	-	Controlo positivo invalido	Repetir reacção
CP	**-**	+	Controlo positivo invalido	Repetir reacção
CN	**-**	+	Controlo negativo inválido	Repetir reacção
CN	**+**	+	Controlo negativo inválido	Repetir reacção
CN	**+**	-	Controlo negativo inválido	Repetir reacção

Guia de resolução de problemas

PROBLEMAS	*POSSIVEIS CAUSAS*	*SUGESTÕES*
Bandas controlo e específicas fracas	Concentração da amostra de DNA baixa	Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Reextraia a amostra de DNA ou tente não adicionar água à mistura de reacção
		Repita a reacção com um DNA de boa qualidade
	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repurifique a amostra de DNA
		Repita a reacção com um DNA de boa qualidade
Os controlos internos falharam em diversos poços	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repurifique a amostra de DNA
		Repita a reacção com um DNA de boa qualidade
	Produtos de amplificação secos	Verifique a selagem das placas
		Repita a reacção utilizando um adaptador de silicone para placas de 96 e/ou adicione óleo mineral.